云 南 植 物 研 究 1998, **20**(1): 76～80
Acta Botanica Yunnanica

黄瓜子叶培养物花芽形成过程的观察 *

姜维梅 杜 勤 梁海曼 钟华鑫
(杭州大学生命科学学院, 杭州 310012)

摘要 黄瓜(*Cucumis sativus*)子叶培养物在离体培养 2～5 d 时, 在子叶柄上可见花原基, 再过 2～3 d, 可见花原基上产生一轮二次突起, 标志着花原基分化已经开始。培养基中添加 kinetin(KT), 可以明显增加花原基的形成数, 可以显著促进花原基的分化和花芽的形成。

关键词 黄瓜, 子叶培养物, 营养芽原基, 花原基, 花萼原基
分类号 Q 945

Observation on the Floral Primordia Formation on the Cucumis Cotyledons Cultured in Vitro

JIANG Wei-Mei Du Qin LIANG Hai-Man ZHONG Hua-Xin
(*College Of Life Science, Hang Zhou University*, Hangzhou 310012)

Abstract Floral primordia formed on the surface of the transitional region between cotyledonary blade and petiole of cucumis in 2～5 days on in vitro cultivation. After further development of 2～3 days, there appeared a whorl of secondary prominences on the surface of floral primordia, which indicated that the fórmation of sepal primordia. Supplementing with kinetin (KT) in the medium, the floral primordial formation and differentiation were promoted and the floral bud formation also improved.

Key words *Cucumis sativus,* Cotyledon cultures, Vegetative primordia, Floral primordia, Sepal primordia

高等植物成花规律和机制长期以来一直受到人们的关注。围绕着烟草、矮牵牛、白芥、红藜、菊苣、拟南芥、金鱼草等材料已经进行了大量的形态、生理和分子遗传学的研究工作。可惜学科间的交叉较少, 这在一定程度上影响了研究工作的精度和深度。比如, 许多成花的生理研究工作都是以肉眼可见的花芽作为衡量各因子与成花是否有关的标准, 因而难以判断各影响因子影响成花过程的确切时期。近年来, 我们在建成黄瓜子叶培养物成花实验系统的基础上(周菊华等, 1992; Pang *et al,* 1993), 进一步深入研究成花机理时, 注意到了这一点, 平行进行了成花形态过程和生理影响的研究。现将黄瓜叶培养物成花初期的形态变化过程介绍如下。

* 国家自然科学基金资助项目 39400078, 浙江省自然科学基金资助项目
1997-01-07 收稿, 1997-04-29 接受发表

1 材料与方法

1.1 无菌苗培育与子叶分化培养

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)杭青 2 号种子用清水漂浮去瘪后, 经 0.1%升汞消毒 8 min, 用无菌水冲洗 3~5 次, 然后播种于 MS 基本培养基上, 置于连续光照、光强 2 500 lx, 25+1 ℃的培养室内培养。取 6 d 苗龄之子叶(留有 1 mm 左右子叶柄)小心地剔除顶芽后, 分别置于 MS 以及 MS 附加 15 mg / L KT 的培养基上培养(培养条件同上)。

1.2 扫描电镜样品的制备

逐日取转接培养后的 0~8 d 的子叶用戊二醛和锇酸进行双固定, 然后梯度酒精脱水, 临界点干燥, 真空镀膜后进行扫描电镜观察。

2 结 果

2.2 花原基与营养芽原基的区别

在扫描电镜下观察花原基的形成和分化初期的进程, 首先应该区别花原基和营养芽原基。一般来讲, 由营养芽的分生组织转变为花的分生组织时, 分生组织体积变大(Gonthier *et al*, 1989)。在扫描电镜下观察到的花原基一般呈球形或馒头形, 花原基的高与直径的比例在 1 左右。花原基形成后, 其上会产生一轮二次突起(图 1: D), 表明花萼原基形成。营养芽原基则较小而顶端稍尖, 呈圆锥状, 其高明显大于直径。根据上述概念并跟踪了原基的分化趋势, 我们可以明确区分营养芽原基和花原基。观察表明, 在子叶身-子叶柄交界处至子叶柄切口处这一区域内, 花原基和营养芽原基有时分别单独出现, 有时也有可能同时出现, 二者不同的外观形态见图 1: A~C。

2.2 花原基的形成和发育以及外源 KT 的作用

在添加有 KT 15 mg / L 的 MS 培养基上, 一般在子叶离体培养后的 2~3 d 即可看到在子叶身-子叶柄交界处至子叶柄切口处这一区域内出现花原基, 第 5 天时可见花原基上再出现一轮二次突起, 此为花萼原基, 表明花器官原基开始形成了。由于从离体当天的子叶柄上未能找到有花原基, 由此可以推断, 花原基的引发应该是在转接培养后发生的。

在不添加激素的 MS 基本培养基上, 一般在子叶离体培养后的 2~5 d 也会出现花原基, 6~8 d 可在花原基上再出现花萼原基。我们在二次实验中共计观察了 30 个样品, 子叶培养物在叶柄部位出现花原基和花萼原基的时间一般还比较稳定, 因而可以归纳进程如表 1。

表 1 不同培养基上黄瓜子叶培养物花原基、花萼原基以及花蕾出现的时程

Table 1 The time courses of the formation of floral primordia, sepal primordia and floral buds on the cotyledon cultures of *Cucumis sativus* on different medium

培养基 medium	花原基形成 floral primordia formation / d	花萼原基形成 sepal primordia formation / d	花蕾出现 floral buds formation / d
MS	2~5	6~8	30~40
MS+KT 15 mg / L	2~3	4~5	30~40

以上事实表明, 花原基形成与花器官原基分化的时间在不同的培养基上是有一定区别的。外源不添加 KT, 花原基以及花器官原基形成的时间会稍迟, 而且花原基, 花蕾的形成数也明显较少(表 2)。看来外源细胞分裂素在引发花原基发生和发育方面并不起有或无的作用, 但促进作用还是明显的。

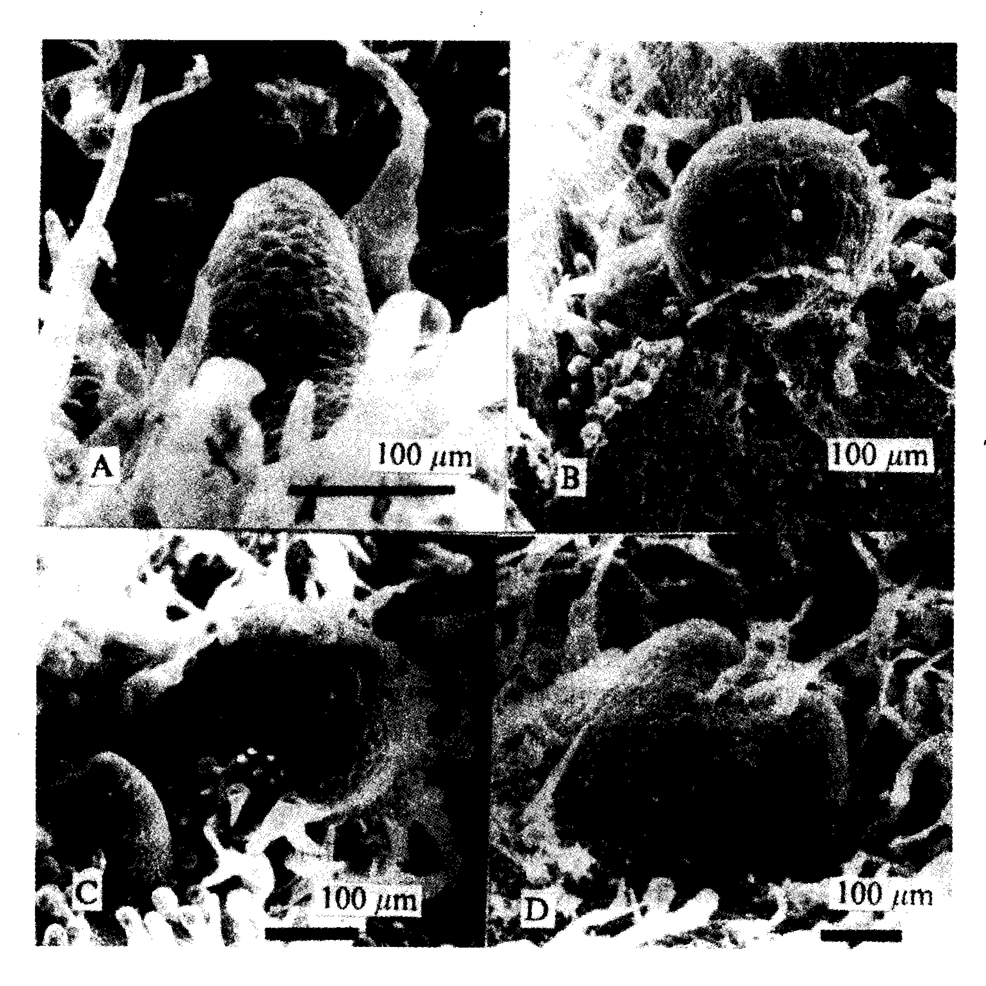


图1 花原基和营养性原基的扫描电镜照片

A. 营养性原基; B. 花原基; C. 同出现于子叶柄处的花原基和营养性原基; D. 花原基上出现的一轮二次突起。

Fig.1 Scanning electron micrographs of floral primordia and vegetative primordia. A: vegetative primordia; B: floral primordia; C: floral primordia and vegetative primordia appeared simultaneously ; D: a whorl of secondary prominences on the surface of the floral primordia

我们在扫描电镜下观察到子叶培养物上花原基的出现并不是同步的。其出现的趋势为：花原基一般是在转接培养后 2 d 开始出现的，3～4 d 花原基的出现呈上升趋势，5 d 以后基本上处于平稳状态。因此，在扫描电镜下观察花原基出现的频率是以转接培养后 5～6 d 的子叶为材料，按子叶柄部位出现花原基的总数占观察的样品数计算百分率。实验中的数值是 2 d 取样观察结果的平均值。每天取材、固定 15 个样品，2 天共计观察了 30 个样品。花蕾出现的频率是以培养的子叶来统计的。子叶培养 35 d 时，按成花子叶数占培养子叶数计算成花百分率。外源添加 KT 对黄瓜子叶培养物上花原基以及花蕾形成的影响见表 2。

从表 2 中可以看出: a. 花原基出现的数目要比花蕾出现的数目多。表明在花原基形成后，并不是每个花原基都能进一步发育成花蕾。花原基形成的条件并不等同于花原基发育的条件。b. 外源 KT 的供应不仅促进了花原基形成，也有助于花原基发育成花蕾。

表 2　KT 对黄瓜子叶培养物上花原基以及花蕾形成的影响

Table 2　Effect of KT on the formation of floral primordia and floral buds on the cotyledon cultures of *C. sativus*

培养基 medium	花原基 floral primordia / %	花蕾 floral buds / %	花蕾 / 花原基 floral buds / floral primordia
MS	19.7	10.8	0.55
MS+KT 15 mg / L	40.5	30	0.74

3　讨　论

整体植物花诱导结束后到花启动花分化的时间间隔比较短, 如: 油菜枝尖分生组织出现第 2 次有丝分裂峰时就发生花原基的启动(Orr, 1984)。*Silene coeli-rosa* 在 7 d 长日诱导结束后 48h 即出现萼片(Francis, 1981)。青萍 6746 在 4 d 短日诱导结束后再过 5 d 即开始出现花①。离体组织器官培养直接成花的进程也大都很快。如: 毒麦枝尖培养物在长日诱导开始后 22 h 花启动, 30 h 后可见某些花特征(McDaniel *et al,* 1991)。花生子叶培养物在培养开始后 2～6 d 期间花启动(Kumar *et al,* 1996)。烟草花柄培养物 12 d 可见花原基(Heylen *et al,* 1991)。烟草薄细胞层培养物在培养开始后 4 d 形成分生组织中心(陈永宁等, 1992), 22 d 已明显见花(RyMeeks-Wagner *et al,* 1989)。本文中黄瓜幼苗子叶培养物在培养 2～5 d 可见花原基, 6～8 d 可见花萼原基, 在成花进程上与上述一些例子是大体相似的。看来, 在花诱导花启动后的成花进程方面, 黄瓜子叶培养物直接成花与其它材料相比, 没有出现明显的特殊性。

外植体离体培养初就有很显著的生理变化, 如供给 BA 后 20 h 即可见有有丝分裂峰值出现(Bernier, 1990)。毒麦枝尖离体培养后 2 h 即可见内源 ABA 水平由剧升转为剧降(McDaniel *et al,* 1991)。对于花生离体子叶培养直接成花, 子叶离体后的 6～24 h, Ca 的存在是必需的(Kumar *et al,* 1996)。这些事实表明, 外植体一进入成花培养即已开始产生各种与成花有关的生理变化。条件适宜时, 离体培养物的花原基引发是完全有可能在离体后的 2 d 内完成的。本文中黄瓜子叶培养物在培养 2～5 d 即可见花原基, 看来对于黄瓜子叶培养物花原基启动生理基础的研究重点应该放在子叶培养后 0～2 d 期间的主要性状变化上。

在扫描电镜的照片上, 我们对原基的直径进行了测量, 结果表明, 其直径在 250～ 300 μm 左右, 而且在解剖镜下清晰可见, 因此, 黄瓜子叶培养物表面所形成的花原基和花器官原基可以作为显微操作外源基因机械导入的受体。这对于我们在探索成花生理学与分子遗传学相结合的过程中提供了很好的应用前景。

参 考 文 献

陈永宁, 李文安, 1992. 烟草花柄离体培养中花芽分化的细胞起源观察. 西北植物学报, **12:** 199～203

周菊华, 马月珍, 罗紫娟等, 1992. 离体黄瓜子叶直接开花的研究. 科学通报, **20:** 1905～1908

Bernier G, Lejeune P, Jacquard A, *et al,* 1990. Cytokinins in flower initiation. In: Pharis RP, Road SB, eds. Plant Growth Substances 1988. Springer Verlag, 486～491

Francis D, 1981. A rapid accumulation of cells in G_2 in the shoot apex of *Silene coeli～rosa* during the first day of floral induction. *Ann Bot,* **48:** 391～394

Gonthier R, Francis D, 1989. Changes in the pattern of cell division in the shoot and root meristems of *Lolium pereune*

①(韩玉珍、钟昕, 孟繁静, 1993. 马拉硫磷对青萍 6746 内源玉米赤霉烯酮生物合成及成花的影响. 上海: 中国植物生理学会第六次全国会议学术讨论会论文汇编. 50

during the transition from vegetative to fioral growth. **J Exp Bot, 40**(211): 265～29

Heylen C, Vendriz J C, Van Onckelen H, 1991. The accumulation and metabolism of plant growth regulators during organogenesis in cultures of thin cell layers of *Nicotiana tabacum*. *Physiol Plant*, **83:** 578～584

Kumar T A, Reddy G M, 1996. Role of benzyladenine, Ca^{2+} ions and AGAMOUS like gene in regulation of in vitro flowering in *Arachis hypogaea L.*. *In Vitro(Cell Dev Biol)*, **32**(3ptII): 83A, P～1071

McDaniel C N, King R W, Evans L T, 1991. Floral determination and in vitro floral determination in isolated shoot apices of *Lolium temulen* L. *Planta*, **105:** 9～16

Orr A R,1984. Histochemical study of enzyme activity in the shoot apical meristem of Brassica campestris L. during transition to flowering. II. Cytochrome oxidase. *Bot Gaz*, **145:** 308～311

Pang J L, Liang H M, Liu F Y *et al*, 1993. Direct formation of male and female flowers from excised cotyledons of cucumis(*Cucumis sativus* L.). *Chinese J Bot*, **5**(2): 185～188

RyMeeks-Wagner DR, Dennis ES, Tran Thanh Van K, *et al*, 1989. Tobacco genes expressed during in vitro floral initiation and their expression during normal plant develepment. *Plant Cell*, **1:** 25～35